

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie



Radovan Fišer

**Fluorescenční studie bakteriálních membránových
proteinů a buněčné signalizace**

(Fluorescence studies of bacterial membrane proteins and cellular signaling)

Dizertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Rád bych velmi poděkoval svému školiteli Ivovi Konopáskovi a konzultantovi Peteru Šebovi za vedení během mé práce, za rady a diskuze ohledně prováděných pokusů a za úpravu rukopisů publikací. Velký dík patří také všem mým kolegům, kteří připravovali důležitý materiál a prováděli jednotlivé pokusy, na které jsem pak mohl svou experimentální práci navazovat. Jedná se o spoluautory přiložených publikací. Děkuji také všem členům laboratoře Fyziologie bakterií, kteří se třeba neúčastnili mých pokusů, ale vytvářeli veselé a přátelské pracovní prostředí. Lucii Jánské děkuji za technickou pomoc při provádění zdoluhavých fluorescenčních pokusů. Oceňuji rovněž snahu svých rodičů, kteří mě vždy podporovali ve studiu a vzdělávání. Své ženě Barboře bych chtěl poděkovat za starost o věci denního života, za obětavost a pochopení pro mou vědeckou práci.

Abstract (English)

This work is based on five publications studying mostly adenylate cyclase toxin (CyaA) from *Bordetella pertussis* and its interaction with biological membranes. CyaA permeabilizes cell membranes by forming small cation-selective pores and subverts cellular signaling by delivering an adenylate cyclase (AC) enzyme that converts ATP to cAMP into host cells.

First study clarifies the membrane disruption mechanisms of CyaA and another bacterial RTX toxin; α -hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. For this purpose, we employed a fluorescence quenching method using liposomes as target membranes. We showed that both toxins induced a graded leakage of liposome content with different ion selectivities (Fišer a Konopásek 2009).

Both AC delivery and pore formation were previously shown to involve a predicted amphipathic α -helix(502-522). In the second publication we investigated another predicted transmembrane α -helix(565-591) that comprises a Glu(570) and Glu(581) pair. We examined the roles of these glutamates in the activity of CyaA, mostly on planar lipid membranes and erythrocytes. Negative charge at position 570, but not at position 581, was found to be essential for cation selectivity of the pore, suggesting a role of Glu(570) in ion filtering close to pore mouth. The pairs of glutamate residues in the predicted transmembrane segments of CyaA appear to play a key functional role in membrane translocation and pore-forming activities of CyaA (Basler et al. 2007).

In the next work we describe a new activity of CyaA that yields elevation of cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in target cells. The CyaA toxin during the bacterial infection targets primarily phagocytes expressing the $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18). The CyaA-mediated $[Ca^{2+}]_i$ increase in CD11b⁺ J774A.1 monocytes was inhibited by extracellular La^{3+} ions but not by any specific inhibitor of cellular channels, suggesting that influx of Ca^{2+} into cells was not because of receptor signaling or opening of conventional calcium channels. The translocating AC polypeptide itself appears to participate in formation of a novel type of unexpected membrane path for calcium ions (Fišer et al. 2007).

We show that penetration of the AC domain across cell membrane proceeds in two steps. It starts by membrane insertion of a toxin 'translocation intermediate', that permeabilizes cells for influx of extracellular Ca^{2+} and thus activates calpain-mediated cleavage of the talin tether. Recruitment of the integrin-CyaA complex into lipid rafts follows and the cholesterol-rich lipid environment promotes full translocation of the AC domain across cell membrane (Bumba et al. 2010).

The ability of CyaA to promote influx of Ca^{2+} into cells dictates the path and kinetics of subsequent endocytic removal of CyaA toxoids from phagocyte membrane. Clathrin-dependent endocytosis and transit of CyaA through transferrin-containing early recycling vesicles was observed with the toxoid capable to promote Ca^{2+} influx and to associate with membrane lipid rafts. This uptake path allowed delivery, processing and presentation of toxoid-fused antigens on MHC class II molecules. In turn, a mutated toxoid, unable to mediate Ca^{2+} influx into cells, was rapidly taken-up from cellular membrane by a clathrin-independent macropinocytic mechanism (Fišer et al. 2011).

Keywords

Bordetella, CyaA, protein translocation, membrane channels, planar lipid membranes, calcium signalling, endocytosis, liposome disruption, macrophage, Fura-2

Abstrakt (česky)

Tato práce shrnuje pět publikací, které se zabývají převážně adenylátcyklázovým toxinem (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis* a jeho interakcí s biologickou membránou. CyaA narušuje buněčné membrány tvorbou malých kationt-selektivních kanálů a rozvrací buněčnou signalizaci pomocí enzymu (AC, adenylátcyklázy) přeměňujícího buněčné ATP na cAMP.

První studie objasňuje mechanismus narušování membrány v případě CyaA a příbuzného RTX toxinu, α -hemolyzinu (HlyA) produkovaného *Escherichia coli*. K tomuto účelu byly použity lipozómy jako umělý membránový systém a fluorescenční zhášecí metoda. Oba zkoumané toxiny vykazovaly postupný únik materiálu z lipozómů a rozdílné iontové selektivity (Fišer a Konopásek 2009).

Jak doprava AC domény, tak tvorba kanálů jsou závislé na vlastnostech predikovaného transmembránového α -helixu (502-522). V naší práci jsme zkoumali další predikovaný transmembránový segment (565-591), který nese kyselé zbytky Glu(570) a Glu(581). Většina pokusů byla prováděna na erythrocytech a planárních lipidových membránách. Zjistili jsme, že záporný náboj v pozici 570 je zásadní pro iontovou selektivitu kanálu a je patrně umístěn v blízkosti jeho ústí. Substituce v obou pozicích zásadně ovlivňují schopnost translokace AC domény (Basler et al. 2007).

Během bakteriální infekce se toxin CyaA primárně váže na fagocytující buňky nesoucí na povrchu $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18). V další studii jsme popsali a zkoumali novou aktivitu CyaA která spočívá ve zvyšování intracelulární koncentrace vápenatých iontů ($[Ca^{2+}]_i$). Toxinem indukovaný nárůst $[Ca^{2+}]_i$ v monocytech J774A.1 nesoucích CD11b nebyl inhibovatelný specifickými inhibitory buněčných kanálů, ale pouze ionty La^{3+} . To naznačuje, že vstup Ca^{2+} do buněk není způsobený buněčnou signalizací. Zdá se, že samotná translokace AC domény vede k přechodnému vpouštění Ca^{2+} do buněk (Fišer et al. 2007).

Samotná translokace se patrně odehrává ve dvou krocích; začíná inzercí AC domény do membrány, kdy dochází k přesunu iontů Ca^{2+} . Tím je spouštěno kalpainem zprostředkované štěpení talinu, který ukotvuje integrin k cytoskeletu. Následkem je přesun uvolněného komplexu integrin-CyaA do lipidových raftů, kde prostředí bohaté na cholesterol umožní dokončení translokace AC domény (Bumba et al. 2010).

Schopnost CyaA indukovat vstup Ca^{2+} do cytoplazmy buněk určuje i posloupnost dalších dějů, které vedou k aktivnímu uklízení CyaA z povrchu makrofágů. Toxoidy schopné vpouštění Ca^{2+} do buněk a přesunu do raftů jsou endocytovány pomocí clathrinových váčků a procházejí časnými endozómy obsahujícími marker transferrin. Tento způsob dopravy umožňuje následné štěpení toxoidu a prezentaci vzniklých peptidů na molekulách MHC I a II. Naopak mutantní toxoidy neschopné vpouštění Ca^{2+} jsou velmi rychle z membrány uklíženy makropinocytózou nezávislou na clathrinu (Fišer et al. 2011).

Klíčová slova

Bordetella, CyaA, translokace proteinu, membránový kanál, planární lipidové membrány, vápníková signalizace, endocytóza, narušování lipozómů, makrofág, Fura-2

OBSAH

Abstract (English)	4
Abstrakt (česky)	5
ÚVOD.....	7
LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
Bakterie Bordetella pertusis	10
Adenylátcyklázový toxin, CyaA.....	10
Adenylát cyklázová (AC) doména CyaA	12
Hydrofóbní doména CyaA	13
Acylační doména CyaA	17
RTX doména CyaA	18
Intracelulární rovnováha iontů Ca ²⁺	19
PUBLIKACE AUTORA.....	23
DISKUZE	29
REFERENCE	33

ÚVOD

Tato práce se zabývá studiem adenylátcyklázového toxinu (CyaA, ACT), který produkuje patogenní bakterie *Bordetella pertussis*, původce černého kašle. CyaA je jeden z klíčových virulenčních faktorů této bakterie – bez tohoto toxinu jsou kmeny *Bordetella pertussis* avirulentní. CyaA se po sekreci z bakterie váže na receptor CD11b/CD18, který se vyskytuje převážně na myeloidních buňkách. Po inzerci toxinu do plazmatické membrány CyaA vykazuje několik po sobě jdoucích aktivit: i) zanořuje do plazmatické membrány svou enzymatickou (AC) doménu, což vyvolává vstup vápenatých iontů do cytoplazmy, ii) následný přesun komplexu CyaA-CD11b/CD18 do membránových raftů umožní dokončit translokaci AC domény, iii) AC doména je v cytoplazmě aktivována buněčným kalmodulinem, což umožní masivní přeměnu buněčného ATP na cAMP. Konečným důsledkem je buď změna buněčné signalizace vlivem Ca^{2+} a cAMP (při nízkých dávkách CyaA) nebo nekróza buněk kvůli dramaticky snížené hladině ATP (při vysokých dávkách CyaA). Kromě výše popsaného mechanismu účinku CyaA na buňky tento toxin ještě vytváří malé kanály selektivní pro monovalentní kationty, které narušením integrity membrány rovněž přispívají k toxicitě CyaA.

Toxin CyaA má zásadní terapeutické a diagnostické využití; v současnosti se testuje jako nosič cizorodých antigenů určených pro vakcinaci proti virovým onemocněním, intracelulárním bakteriálním patogenům a některým typům rakoviny. Pro tyto účely se využívá mutovaná forma CyaA, kdy je jednou bodovou mutací zrušena enzymatická (AC) aktivita a dalšími mutacemi snížena schopnost toxinu vytvářet kationt-selektivní kanály. Do takto upraveného toxoidu se pak geneticky vkládá oligopeptid odpovídající dopravovanému antigenu. Za určitých okolností je pak takový peptid translokován s AC doménou do „napadených“ hostitelských buněk, které nesou receptor CD11b/CD18, jsou schopny AC doménu rozštěpit a vložený epitop prezentovat na svém povrchu. Takovéto využití detoxifikovaného CyaA v sobě skrývá celou řadu výhod. Předně je vakcína směřována cíleně na antigen-prezentující buňky a je tedy možné používat relativně nízké dávky toxoidu. Dále je možné kombinovat několik různých epitopů jak pro prezentaci na MHC-I, tak MHC-II, neboť část toxinu je z povrchu buněk vstřebávána do fagocytujících buněk endocytózou. Takováto kombinovaná rekombinantní vakcína tedy dokáže v pacientovi vyvolat imunitní odpověď zprostředkovanou protilátkami a zároveň cytotoxickými T-lymfocyty.

Moje práce vznikla na Katedře genetiky a mikrobiologie, PřF, Univerzity Karlovy v

Praze pod vedením doc. Iva Konopáska a v úzké spolupráci s týmem dr. Petera Šeba (Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů, Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.), který se toxinu CyaA věnuje již od devadesátých let minulého století. Tato dizertační práce navazuje na podobně zaměřenou práci diplomovou, kterou jsem obhájil v roce 2003.

Jedním z hlavních cílů výzkumu CyaA je objasnění způsobu, jakým se enzymatická AC doména dostává přes buněčnou membránu. Jde patrně o unikátní mechanismus, ke kterému stačí samotná molekula CyaA, vhodné složení biologické membrány a membránový potenciál. Vybrané konkrétní cíle rozsáhlého výzkumu, na němž jsem se podílel se dají stručně shrnout do následujících bodů:

- 1) Charakterizovat mechanismus účinku CyaA na umělých membránách bez buněčného receptoru. Tento bod zahrnuje pokusy na lipozómech a na planárních lipidových membránách (v laboratoři prof. Rolanda Benze, Univerzita ve Würzburgu). V současnosti je vcelku jasné, že se působení CyaA na umělých systémech podstatně liší od účinku na živé buňky, které jsou schopné udržovat membránový potenciál, gradienty iontů a „uklízet“ navázaný toxin z membrány pomocí endocytózy a pomocí proteolytické degradace CyaA. Přesto je systém planárních lipidových membrán (planar lipid membranes) nenahraditelný pro svou jednoduchost při charakterizaci kanálů různých mutantních forem CyaA.
- 2) Během pokusů ve spolupráci s dr. Janem Krůškem (FgÚ, AV ČR) se ukázalo, že CyaA vyvolává kromě tvorby kanálů pro monovalentní kationty také otevírání porů propouštějících vápenaté ionty. Následující výzkum měl zjistit, jestli se jedná o buněčné vápníkové kanály, které by CyaA pouze aktivoval, nebo jestli jde o samostatnou novou aktivitu CyaA.
- 3) Další otázkou bylo, jaký význam má zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} toxinem CyaA na toxin samotný a na buněčnou fyziologii vůbec. V pokusech prováděných převážně dr. Ladislavem Bumbou jsme zkoumali membránový „traficking“ CyaA a přesun komplexu CyaA+CD11b/CD18 do raftů. V zatím posledních pokusech jsme se s dr. Jiřím Mašínem a dalšími kolegy věnovali vlivu Ca^{2+} na endocytózu CyaA.

Tento výzkum byl finančně podporován následujícími granty:

Výzkumné záměry Akademie věd České republiky AV0Z50200510 a AV0Z50520701, Výzkumný záměr Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT) MSM0021620858, Projekt GAAV IAA500200914, Projekt MŠMT LC06034.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

○ **Bakterie *Bordetella pertussis***

Bakterie *Bordetella pertussis*, která produkuje toxin CyaA patří mezi závažné lidské patogeny, vyvolává pertusi, černý (dávivý) kašel. V současné době (zima 2010/11) se navíc v mnoha zemích celé planety (převážně však severní Ameriky a Evropy) projevují nedostatky současné celobuněčné vakcíny proti *Bordetella pertussis* a dochází k nečekanému nárůstu počtu případů tohoto onemocnění, s tím, že tato situace hraničí s epidemií (de Greeff et al. 2010; Hochwald et al. 2010; Kretzschmar et al. 2010; Baugh a McCarthy 2010; Zouari et al. 2011).

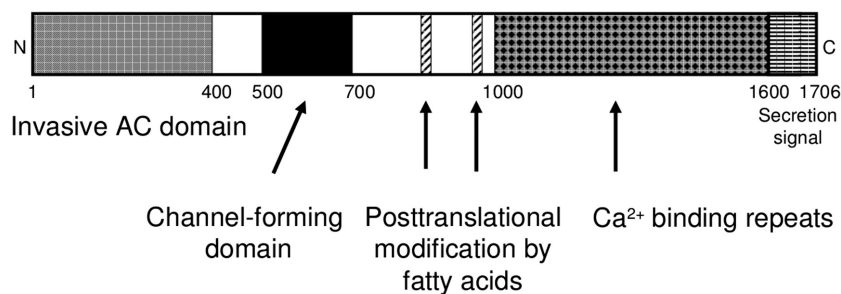
Každá bakterie, která je endogenním patogenem mnohobuněčných organizmů si vyvinula určitou specifickou schopnost pronikání do hostitelského organismu a celou řadu mechanismů, které jí umožní v tomto hostiteli přežít, namnožit se a infikovat dalšího hostitele. Patogenní bakterie vytvářejí nejrůznější struktury a látky, které jim pomáhají ve zmiňovaném procesu. Bakterie *Bordetella pertussis* patří mezi extracelulární patogeny a jedním z prvních úkolů je tedy přichycení na hostitelskou buňku. K tomu slouží například filamentózní hemaglutinin (Urisu et al. 1986; Relman et al. 1989; Lamberti et al. 2009), fimbrie (van den Berg et al. 1999) a pertaktin (Bassinnet et al. 2000). V dalších krocích infekce začne bakterie produkovat exotoxiny, které mají za úkol snížit obranyschopnost hostitele, rozrušit napadenou tkáň a tak zpřístupnit bakterii živiny pro další růst. Jedná se například o dermonekrotický toxin (DNT), pertusový toxin (PTX) a adenylátcyklázový toxin (CyaA). Kromě znížených faktorů virulence *B. pertussis* navíc obsahuje ve své buněčné stěně lipopolysacharid (LPS), který působí v hostitelském organismu jako endotoxin.

Detailům biologie *Bordetella pertussis* a funkci jejích jednotlivých toxinů se věnují různé přehledové články z poslední doby (Locht et al. 2001; Mattoo a Cherry 2005; Mattoo et al. 2001).

○ **Adenylátcyklázový toxin, CyaA**

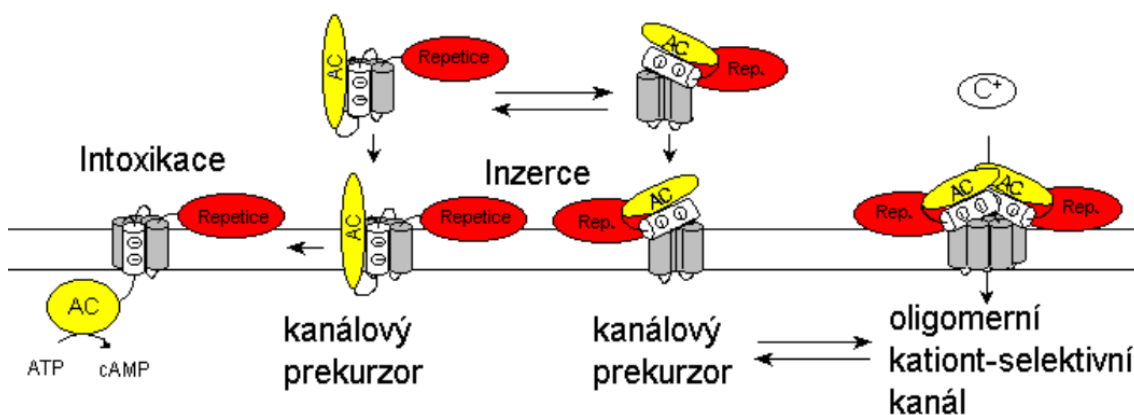
Toxin CyaA, kterému je věnována tato práce, patří mezi takzvané RTX toxiny, tedy do skupiny proteinů obsahujících zcela charakteristické repetitivní motivy (Repats in ToXin) ve své aminokyselinové sekvenci (Linhartova et al. 2010). Gen pro CyaA leží na chromozomu ve společném operonu s pomocnými geny; proteiny exprimované z genů cyaB, D, E jsou

zodpovědné za transport toxinu, produkt genu *cyaC* za posttranslační modifikaci CyaA (Šebo et al. 1991). Toxin CyaA je značně velký polypeptid o 1706 aminokyselinách a molekulové hmotnosti 177 kDa. Celá molekula se skládá z několika částí (viz Obr. 1): enzymatická (AC) doména, hydrofóbní oblast s transmembránovými helixy, acylační doména, repetitivní doména a C-koncový sekreční signál. Celá molekula CyaA obsahuje 15 tryptofanových zbytků, které je možné využít pro fluorescenční studie, a neobsahuje žádný zbytek cysteinový.



Obr. 1. Schéma domén toxinu CyaA

Toxin CyaA se primárně váže na buňky nesoucí integrinový receptor CD11b/CD18 (Guermontprez et al. 2001). Kromě toho se může s řádově nižší afinitou vázat i na buňky bez tohoto receptoru, patrně prostřednictvím glykosylovaných povrchových proteinů (Morova et al. 2008), případně i do umělých membrán zcela bez proteinového receptoru (Benz, Maier, et al. 1994; Mašín et al. 2005; Osičková et al. 1999; Vojtova-Vodolanova et al. 2009). Mechanistický model interakce CyaA s membránou je shrnutý na Obr. 2.

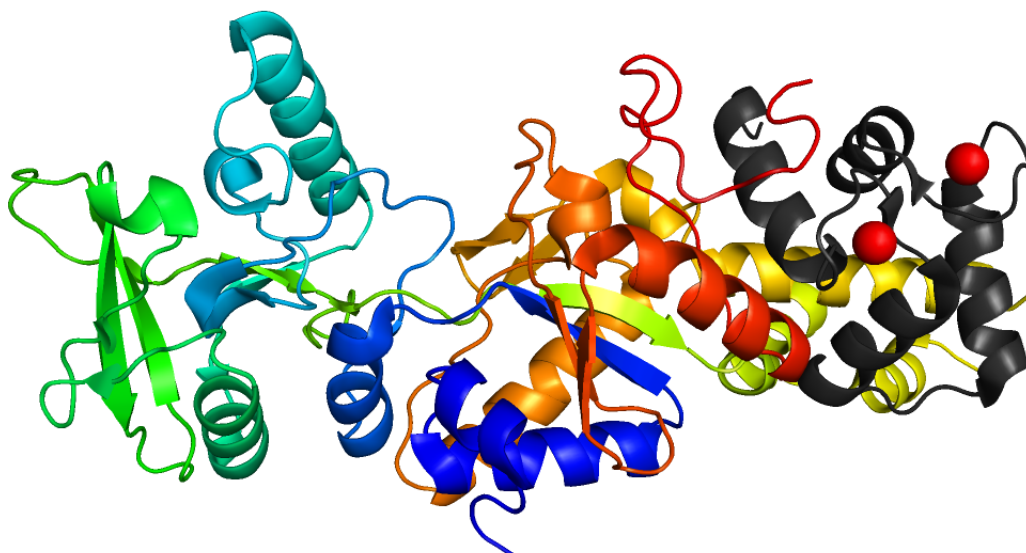


Obr. 2. Model interakce CyaA s biologickou membránou (Osičková et al. 1999).

CyaA se patrně nachází v roztoku ve formě dvou různých konformerů, jeden upřednostňuje oligomerizaci a tvorbu kationt-selektivních kanálů, druhý je zodpovědný za translokaci AC domény do cytozolu buněk, kde je následně přeměňováno buněčné ATP na cAMP.

▪ Adenylát cyklázová (AC) doména CyaA

Enzymatická AC doména (přibližně AA 1-400) je část CyaA, která je po odštěpení samostatně funkční a po aktivaci kalmodulinem štěpí ATP na cAMP a pyrofosfát (Wolff et al. 1980). Aby k tomu mohlo dojít, musí být nejprve AC doména translokována do cytozolu buňky přes plazmatickou membránu (Rogel a Hanski 1992). Tento proces je zajišťován zbytkem molekuly CyaA (Confer a Eaton 1982; Hackett, L Guo, et al. 1994; Glaser et al. 1988) a patrně nevyžaduje žádné buněčné kofaktory kromě cholesterolu (Bumba et al. 2010). Translokace AC domény je rychlý proces v řádu sekund až minut od přidání CyaA k buňkám a zřejmě je prováděna monomery CyaA (M Gray et al. 1998). Trojrozměrná struktura AC domény v komplexu s částí kalmodulinu byla nedávno vyřešena (Q Guo et al. 2005) a je uvedena na Obr. 2.



Obr. 2. Trojrozměrná struktura AC domény CyaA (duhově), C-koncová část kalmodulinu (černě), vápenaté ionty vázané na kalmodulin (červeně). PDB: 1YRT.

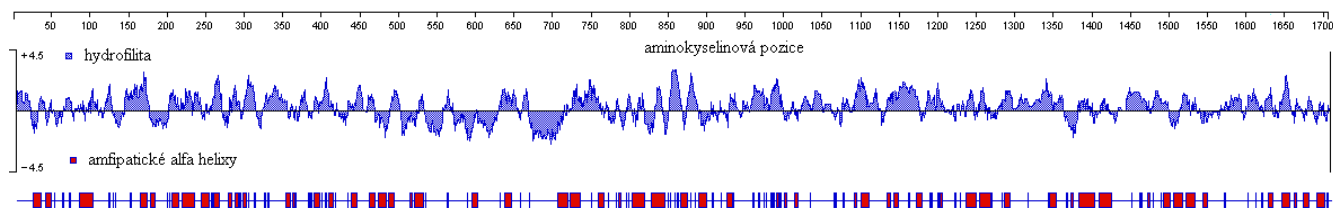
Způsob, jakým se AC doména dostává přes buněčnou membránu není dosud objasněn. Je vcelku zřejmé, že pro translokaci AC domény musí dojít k jejímu celkovému rozvolnění, aby se mohla přes membránu vůbec dostat. Pro translokaci AC domény je nutný zbytek molekuly CyaA, fyziologická koncentrace Ca^{2+} a fyziologický membránový potenciál (Otero et al. 1995). Buněčný receptor CD11b/CD18 pro translokaci potřebný není, jen zvyšuje efektivitu vazby celého toxinu na buňky (Martin et al. 2004). Lákavá hypotéza, že by se translokace mohla odehrávat prostřednictvím kanálu, který CyaA v membráně tvoří se zdá být vyloučena, neboť tyto kanály mají velmi malý průměr. U těch mutantních forem CyaA, které kanály

prakticky vůbec netvoří, ke translokaci docházet může (Osičková et al. 2010). Za zmínku stojí skutečnost, že některé části AC domény je možné nahradit různě dlouhými peptidy, které jsou zbytkem molekuly CyaA rovněž translokovány přes membránu a mohou být prezentovány na MHC glykoproteinech. U těchto konstruktů však musí být zachován celkově kladný náboj translokovaného peptidu. (Mackova et al. 2006; Karimova, Fayolle, et al. 1998).

AC doména se dá rozdělit ještě na dvě další subdomény: T25 (AA 1-224, na Obr. 2 modrá a zelená) a T18 (AA 225-399, na Obr. 2 žlutá a červená), které si po proteolytickém odštěpení zachovávají schopnost vazby kalmodulinu (T18) a štěpení ATP (T25) (Munier et al. 1991; Mock a Ullmann 1993). Pokud se tedy obě subdomény dostanou dostatečně blízko k sobě v přítomnosti kalmodulinu, je obnovena schopnost enzymu syntetizovat cAMP. Těto vlastnosti se prakticky využívá pro sledování protein-proteinových interakcí v bakteriálním dvouhybridním systému (Karimova, Pidoux, et al. 1998), kdy se dva potenciální vazební partneři geneticky fúzí se subdoménami T25 a T18. Pokud k interakci opravdu dochází, produkuje se cAMP, který je dále detekován katabolickým aktivátorovým proteinem (CAP), aktivujícím katabolický operon, což umožňuje selektovat bakteriální buňky například na schopnost růst na maltóze nebo laktóze (Dautin et al. 2002; Ladant a Ullmann 1999).

▪ Hydrofóbní doména CyaA

Celá molekula CyaA obsahuje řadu míst se zvýšeným výskytem hydrofóbních aminokyselin (viz Obr. 3). Podstatné je však jejich seskupení v oblasti mezi zbytky 500-700, které je nazýváno hydrofóbní doménou (Hanski 1989). Jedná se o oblast, jejíž delece zruší schopnost vazby CyaA na biologické membrány. Mutace v této části proteinu mění vlastnosti kanálů, které CyaA vytváří (Osičková et al. 1999). Část molekuly v rozsahu 400-1706 (zahrnující tedy ještě acylační a RTX doménu) je někdy nazývána hemolyzinová část, protože je postačující pro tvorbu kanálů (Benz, Maier, et al. 1994) a lyzi erytrocytů (Sakamoto et al. 1992).



Obr. 3. Hydrofóbní úseky molekuly CyaA. Modrý graf znázorňuje relativní zastoupení hydrofóbních aminokyselin, algoritmus Kyte a Doolittle (1982) (výchylka dolů značí výskyt nepolárních aminokyselinových zbytků, výchylka nahoru značí výskyt polárních zbytků). V úseku mezi aminokyselinovými zbytky v pozicích 500 až 700 je vidět zvýšený obsah nepolárních zbytků v několika segmentech. Červeně je znázorněno zastoupení teoretických amfipatických α -helixů, algoritmus Eisenberg et al. (1984). Pro tvorbu grafu byl použit software Protean, verze 4.03 od firmy DNASTAR (upraveno).

Předpokládá se, že hydrofóbní doména tvoří pět transmembránových helixů, které se zabudovávají do buněčné membrány a vytváří toxinový kanál (Osičková et al. 1999).

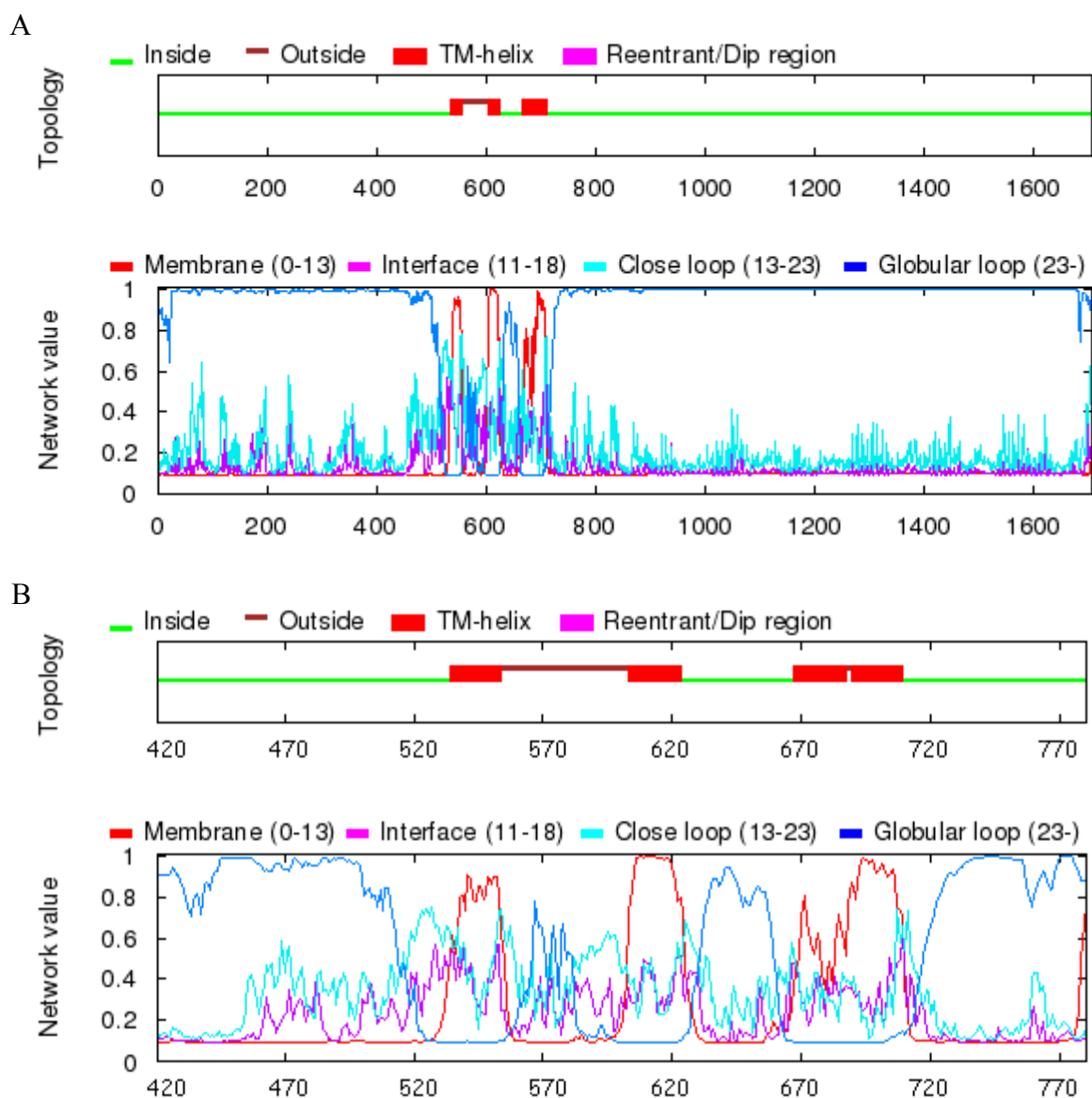
Primární sekvence těchto helixů je znázorněna v Tabulce 1.

Průměrná hydrofobicita	AA úsek CyaA	Sekvence predikovaného transmembránového úseku
0.53	176–196	VIGNAAGIPLTADIDMFAIMP
0.49	502–522	AAVFGLG E ASSAVA E TVSGFF
0.69	529–549	AGGFGVAGGAMALGGGIAAAV
0.53	570–591	E IALQLTGGT V ELASSIALALA
0.57	607–627	AGAAAGALAAALSPMEIYGLV
0.69	678–698	VGAAVSIAAAASVVGAPVAVV
0.48	1359–1379	AHAGIAAGRIGLGLADLGAG

Tab. 1. Predikované transmembránové úseky v celé primární sekvenci CyaA (Osičková et al. 1999). Tučně jsou důležité glutamátové zbytky. Hydrofobicita jednotlivých úseků byla vypočítána podle algoritmu Eisenberg et al. (1984).

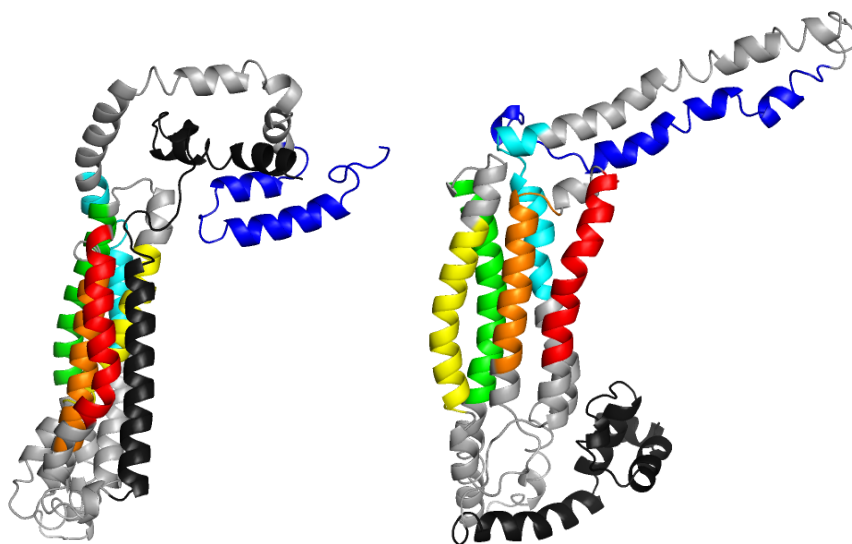
Pomocí cílené mutagenese byla připravena sada bodových mutantů v předpokládaném transmembránovém segmentu mezi aminokyselinovými zbytky 502-522. Záměnami glutamátových zbytků za prolinové a lyzinové zbytky se podařilo prokázat, že právě tento transmembránový helix hraje klíčovou úlohu při translokaci adenylátcyklázové domény do cílových buněk. Změnou náboje neseného tímto segmentem CyaA se podařilo zvýšit frekvenci tvorby jeho iontových kanálů a zároveň snížit jejich selektivitu pro kationty. Z toho

vyplývá, že se tato oblast pravděpodobně přímo podílí na tvorbě kationt-selektivního kanálu v cílových membránách (Osičková et al. 1999). Prostorové rozmístění transmembránových helixů není přes intenzivní výzkum stále jednoznačné. Predikce membránové topologie se liší podle použitého modelu, některé algoritmy předpokládají výskyt pouze čtyř transmembránových helixů (viz Obr. 4).



Obr. 4. Predikované transmembránové úseky CyaA (červeně), části proteinu na povrchu membrány (fialově) a smyčky (modře). A) Celá sekvence CyaA (AA 1-1706), B) výřez hydrofóbní oblasti CyaA (AA 420-780). Pro predikci transmembránových úseků byl použit program Octopus <http://octopus.cbr.su.se/>, (Viklund a Elofsson 2008).

Naše předběžné modely hydrofóbní domény (nepublikované výsledky) vygenerované programem RosettaMembrane 3.1 (Yarov-Yarovoy et al. 2006) jsou poměrně v souladu s předchozími představami, které vycházely z jiných algoritmů (Osičková et al. 1999). Počet predikovaných transmembránových segmentů je zpravidla pět, popřípadě šest, pokud je AC doména ještě před translokací (viz Obr. 5). Zajímavý je tento soulad modelů především proto, že program RosettaMembrane využívá v některých krocích výše zmíněného programu Octopus, který ale předpokládá transmembránové helixy pouze čtyři. Na modelu je rovněž vidět interakce prvního stálého transmembránového helixu (Obr. 5, červeně) s N-koncovou oblastí patrně zajišťující translokaci celé AC domény (černě). Během výpočtu tohoto modelu jsem se zatím nezabýval tvorbou oligomerů v membráně, model tedy nelze použít pro představy o kanálu CyaA v membráně.



Obr. 5. Model transmembránové oblasti CyaA (rozsah AA 421-781), vlevo model před translokací AC domény, vpravo po translokaci. Membrána je umístěna vodorovně (nezobrazeno) a transmembránové helixy jí procházejí svisle. Extracelulární prostor je nahoře, intracelulární dole. N-koncová část směrem k AC doméně je znázorněna černě, C-konec směrem k RTX doméně tmavě modře. Ostatními barvami jsou znázorněny amfipatické helixy podle Tab. 1: červeně AA 502–522, oranžově 529–549, žlutě 570–591, zeleně 607–627 a světle modře 678–698. Tento předběžný model (R. Fišer, nepublikováno) byl získán pomocí Ab Initio predikce 3D struktury programem RosettaMembrane 3.1 (Yarov-Yarovoy et al. 2006).

Hydrofóbní doména je zodpovědná za tvorbu kation-selektivních kanálů v membráně (Benz, Maier, et al. 1994). Tomu musí předcházet oligomerizace CyaA, která je závislá na celé hemolyzinové části včetně RTX domény (Vojtova-Vodolanova et al. 2009). Vnitřní průměr kanálů je vzhledem k celkové velikosti proteinu nečekaně malý, okolo 0,6-0,8 nm (Ehrmann et al. 1991; Benz, Maier, et al. 1994), přesto jsou tyto kanály zodpovědné za únik

iontů K^+ z erytrocytů a jejich koloidně osmotickou lyzi (Gray et al. 1998). Existují dřívějšíh hypotézy, podle kterých není primárním významem kanálu CyaA narušení biologické membrány, ale podpora translokace AC domény (Rogel a Hanski 1992; Rogel et al. 1991). Podle novějšíh studií se kanály CyaA účastní úniku iontů K^+ i u buněk nesoucích receptor CD11b (Dunne et al. 2010; Osičková et al. 2010) a přispívají k cytotoxicitě vůči fagocytům (Basler et al. 2006).

▪ Acylační doména CyaA

Další důležitou částí CyaA je oblast s poměrně slabě konzervovanou sekvencí, která je rozpoznávána bakteriální acyltransferázou CyaC. Tento enzym produkovaný *B. pertussis* rozpoznává primární sekvenci v okolí LysK983 a na ϵ -amino skupinu tohoto lyzinu váže kyselinu palmitovou. Tato postranlační modifikace je naprosto nezbytná pro vazbu CyaA (a všech ostatních RTX toxinů) do buněčných membrán ať už s receptorem (El-Azami-El-Idrissi et al. 2003), nebo bez něj (Basar et al. 2001; Hackett, GUO, et al. 1994). Zatím není zřejmé, jestli se mastná kyselina na CyaA přímo zabudovává do biologických membrán, nebo jestli je jen zodpovědná za správnou konformaci CyaA, která pak vazbu do membrány umožní.

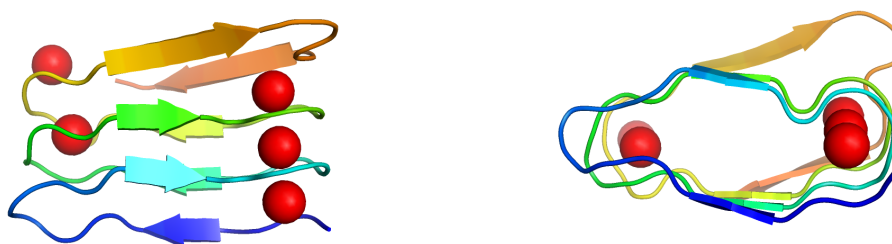
V případě, že jsou proteiny CyaA a CyaC produkovány v rekombinantní formě bakterií *Escherichia coli*, dochází navíc k acylaci na Lys860. Tato druhá modifikace však není pro funkci CyaA kritická (Mašín et al. 2005). Zajímavé je, že dvojitou acylací dochází naopak ke snížení hemolytické aktivity CyaA, zatímco schopnost translokace AC domény je stejná jako u toxinu produkovaného bakterií *Bordetella* (Šebo et al. 1991). Snížená hemolytická aktivita je přitom dána menším množstvím vytvořených kanálů; jejich vlastnosti jinak zůstávají nezměněné (Betsou et al. 1993; Šebo et al. 1991; Hackett et al. 1995). Z některých studií vyplývá, že Lys860 patrně hraje v CyaA důležitou strukturní roli, která je acylací (a případnými mutacemi) blokována (Basar et al. 1999; Mašín et al. 2005).

Toxin produkovaný v nepřítomnosti proteinu CyaC je zcela neacylovaný (forma pro-CyaA) a v této práci je využíván často jako negativní kontrola neschopná vazby na buňky.

▪ RTX doména CyaA

V C-koncové části CyaA se nalézají sekvence, kvůli kterým je tento toxin řazen mezi RTX proteiny. Nalézá se zde pět podobných bloků ohraničených různě dlouhými „linkery“, každý blok obsahuje okolo osmi repetitivních devítiaminokyselinových sekvencí (Glaser et al. 1988). V RTX doméně se nalézá malý počet (3-5) vysokoafinních míst pro Ca^{2+} (K_D asi 1 nM) a asi 40 nízkoafinních míst (K_D asi 0,5 až 0,8 mM) (Rose et al. 1995; Rhodes et al. 2001).

Každá repetice se skládá z devíti až jedenácti aminokyselin, kde konsenzuální sekvence je: U X G G X G X D X Z X, kde U značí jednu z aminokyselin: (L/I/F), a Z jednu z aminokyselin: (L/I/V/W/Y/F). Tyto repetitivní motivy se seskupují do celých bloků a vytváří v proteinech rozsáhlé domény. Každá repetice je schopna chelatovat jeden iont Ca^{2+} , sekvence mezi repeticemi tvoří beta listy, které se po vazbě vápníku seskupují do zcela pravidelné nadšroubovice (Rhodes et al. 2001), viz Obr. 6.

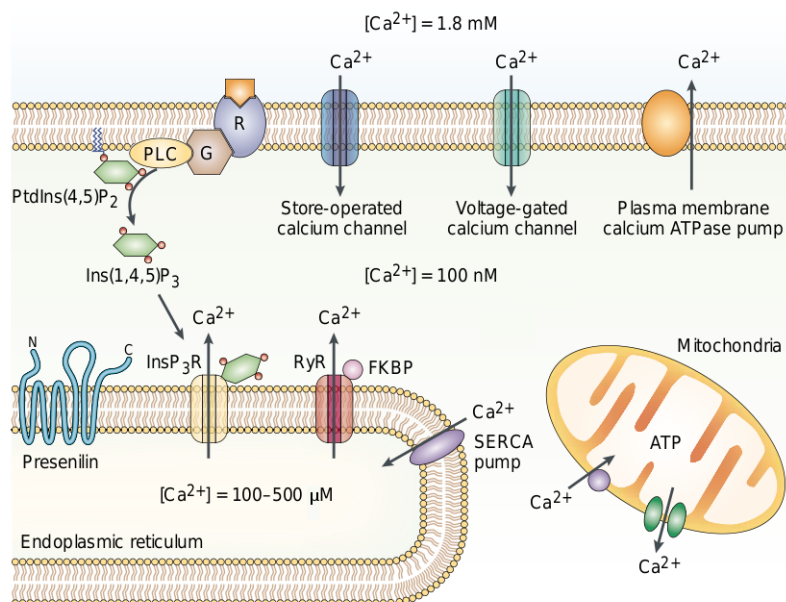


Obr. 6. Část RTX domény se sedmi repeticemi, tedy smyčkami vázajícími Ca^{2+} (červeně), vlevo pohled kolmo na osu RTX bloku, vpravo pohled v ose. PDB: 2ZVD.

RTX doména je zodpovědná za správné sbalování CyaA (nebo alespoň jeho hemolyzinové části) v přítomnosti vápenatých iontů. Trojrozměrná struktura celé RTX domény není známá, existuje pouze představa o uspořádání samotných repetitivních segmentů (Obr. 6) na základě rentgenostrukturních studií příbuzných proteinů. Dosud není zřejmé, zda se RTX doména může přímo účastnit vazby CyaA na biologické membrány, případně jestli napomáhá translokaci AC domény. V RTX doméně je vazebné místo pro integrin CD11b/CD18 (Guermontez et al. 2001).

○ **Intracelulární rovnováha iontů Ca^{2+}**

Jedna z publikací, které jsou součástí této práce se přímo zabývá efektem CyaA na intracelulární koncentraci iontů Ca^{2+} (Fišer et al. 2007). Další dvě publikace na tuto práci bezprostředně navazují (Bumba et al. 2010; Fišer et al. 2011). Proto zde podávám stručný přehled o důležitosti těchto iontů pro buněčnou signalizaci. Ionty Ca^{2+} jsou zásadní pro celou řadu buněčných aktivit a funkcí, sehrávají úlohu takzvaného druhého posla. Koncentrace volných iontů Ca^{2+} v cytoplasmě buněk ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) řídí hlavně aktivitu enzymů a přenos elektrického signálu na buněčné membráně (Wulf-Johansson et al. 2010), ale také genovou expresi (Alford et al. 2003), replikaci, buněčný cyklus (Taylor et al. 2008), pohyb a tvar buněk (Shevchuk et al. 2001) a další. Této problematice se věnují rozsáhlé přehledové články (Clapham 1995; Berridge et al. 1998). Klidová koncentrace Ca^{2+} v cytosolu je řádově 100 nM. Jako zásobárna vyšších koncentrací iontů Ca^{2+} slouží jednak extracelulární prostředí, kde jsou ionty Ca^{2+} přítomny v koncentraci okolo 2 mM, a také buněčné organely. U svalových buněk jde převážně o sarkoplazmatické retikulum. U lymfocytů, které jsou přirozeným cílem CyaA, je Ca^{2+} skladován v mitochondriích a endoplazmatickém retikulu (ER), viz Obr. 7 (LaFerla 2002).



Obr. 7. Model intracelulární rovnováhy iontů Ca^{2+} . Přejato z LaFerla (2002).

Uvnitř ER se ionty Ca^{2+} nacházejí v koncentraci asi 100–500 μM a vážou se na různé proteiny, jako endoplazmin, calreticulin a disulfid izomerázy (Rowling et al. 1994). Ionty Ca^{2+}

se obecně mohou z ER uvolňovat dvojitým způsobem: receptorem inositol-1,4,5-trisfosfátu (InsP3R) nebo ryanodinovým receptorem (RyR), který však na námi používaných buňkách není exprimován (Mackrill et al. 1997).

Otevírání kanálu InsP3R je spuštěné vazbou inositol-3-fosfátu (Ins(1,4,5)P3), který je produktem štěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP2) posfolipázou C. Tento enzym je aktivován nejrůznějšími povrchovými proteiny, např. integriny, proteiny vázajícími G-proteiny (GPCR), růstovými faktory a cytokiny (DeMali et al. 1997; Short et al. 2000). Význam ER v konkrétní buněčné vápníkové signalizaci se dá zjistit tím, že se ER před pokusem Ca^{2+} vypustí a tedy vyřadí z dalších odpovědí. Nejčastěji se blokuje SERCA pumpa (sarco-/endoplasmic reticulum calcium ATPase) pomocí thapsigarginu.

Vliv mitochondrií, které jsou významnou zásobárnou Ca^{2+} (Nicchitta a Williamson 1984), na buněčnou signalizaci se rovněž většinou zjišťuje jejich deaktivací, například pomocí protonoforu FCCP (Sergeant et al. 2008). Tento typ pokusů nicméně může být zatížen artefakty spojenými s vlivem protonoforů na potenciál plazmatické membrány (To et al. 2010).

Pro spouštění vápníkové signalizace se někdy využívá Ca^{2+} z extracelulárního prostoru. Přes plazmatickou membránu se ionty Ca^{2+} dostávají kanály řízenými ligandem (ligand-gated channels, LGCC), kanály ovládanými ionty Ca^{2+} z vnitřních organel (store-operated calcium channels – SOCCs) a kanály ovládanými napětím (voltage-dependent calcium channels, VGCC). Poslední jmenované se vyskytují pouze na excitovatelných buňkách (LaFerla 2002).

Po zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v cytoplazmě tyto ionty aktivují různé proteiny; kalmodulin, kalpain, kalcineurin, troponin C, kalbindin, a jiné. Každý z těchto proteinů pak sehrává specifickou úlohu buněčné signalizaci (Goll et al. 2003; Timmins et al. 2009; Kmetzsch et al. 2010; Barski et al. 2003). Efekt zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pak závisí na prostorovém a časovém rozložení vápníkového signálu. Běžná buněčná signalizace vyvolaná ionty Ca^{2+} je většinou spouštěna krátkodobým zvýšením $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dlouhodobé zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je pro buňku letální a většinou vede k apoptóze (Walter a Hajnoczky 2005).

Jak ukazují práce z poslední doby, působení bakteriálních toxinů může vyvolávat v cílových buňkách změny v koncentraci vápenatých iontů, které hrají velmi významnou úlohu ve vnitrobuněčné fyziologii a regulaci celé řady životních funkcí buněk. Jaký je přesný význam těchto změn není doposud zcela jasné, ale oscilace v koncentraci vápenatých iontů

indukované toxinem mohou vést až ke změnám v genové expresi buňky a produkci specifických cytokinů (Uhlen et al. 2000; Nhieu et al. 2004).

Některé bakteriální toxiny mohou ovlivňovat vnitrobuněčnou koncentraci vápníku. Nedávno bylo zjištěno (Uhlen et al. 2000), že RTX toxin α -hemolyzin (HlyA) z uropatogenní bakterie *Escherichia coli* je schopen vyvolat v cílových epiteliálních buňkách vápníkové oscilace. Autoři předpokládají, že se tyto oscilace spouští napadená buňka jako obranný mechanismus proti dlouhodobě zvýšené intracelulární koncentraci Ca^{2+} . Tyto oscilace navíc spouští expresi nových genů - cytokinů IL-6 a IL-8. Povaha signálu, který spouští otevírání a zavírání kanálů pro vápník jako odpověď buněk na interakci s toxinem zůstává nadále nejasná. Objevila se i práce, která u tohoto toxinu naznačuje i možnost přímé účasti kanálů HlyA ve vápníkových proudech na membráně (Koschinski et al. 2006).

V případě dalšího RTX toxinu, proteinu LtxA z bakterie *Mannheimia haemolytica* bylo zjištěno, že interakce toxinu s bovinními leukocyty vede k zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$. To je způsobeno jednak vstupem vápníku přes kanály v cytoplazmatické membráně a jednak uvolněním vápníku z endoplazmatického retikula (Cudd et al. 2003).

Zajímavá souvislost mezi vnitrobuněčnou koncentrací vápníku a enzymatickou aktivitou toxinu byla objevena u edema toxinu bakterie *Bacillus anthracis* (Kumar et al. 2002). Tento toxin je podobně jako CyaA schopen translokovat do cytozolu cílové buňky svou enzymatickou adenylátcyklázovou doménu. Autoři ukázali, že po translokaci toxinu dochází ke vstupu vápníku do buněk přes vápníkové kanály lokalizované v plazmatické membráně. Tímto způsobem si toxin „upravuje“ vnitrobuněčnou koncentraci vápníku, neboť jeho adenylátcyklázová aktivita vyžaduje vazbu kalmodulinu, jehož afinita pro edema faktor je dramaticky závislá na vnitrobuněčné koncentraci vápenatých iontů. Změny v koncentracích volného vápníku v cílových buňkách byly pozorovány také pro skupinu toxinů, schopných tvořit póry v plazmatické membráně cílových buněk (stejně jako CyaA patří do rodiny tzv. „pore-forming“ toxinů). Krause (1998) zjistil, že aerolyzin z bakterie *Aeromonas hydrophila* indukuje zvýšení hladiny $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v lidských granulocytech. Na tomto jevu se podílí jednak vstup vápníku z extracelulárního prostředí přes póry tvořené aerolyzinem v kombinaci s toxinem indukovaným uvolňováním vápníku z endoplazmatického retikula signalizací přes G-proteiny, fosfolipázu C a inositol trifosfát (IP_3). V nedávné době bylo ukázáno, že listeriolyzin z bakterie *Listeria monocytogenes* (Repp et al. 2002) a pneumolyzin z bakterie *Streptococcus pneumoniae* (Cockeran et al. 2001) indukují svou kanálotvornou aktivitou vstup vápníku z extracelulárního prostředí do cytozolu napadené buňky. Listeriolyzin je navíc

schopen v buňce indukovat vápníkové oscilace, které jsou řízené otevíráním a zavíráním pórů tvořených toxinem.

Adenylátcyklázový toxin je složitá molekula, kombinující vlastnosti výše zmíněných toxinů. Z toho je patrné, že odpověď buňky na interakci CyaA s hostitelkou buňkou měřená změnami koncentrace intracelulárního vápníku, může být komplexnější povahy, než v uváděných příkladech.

PUBLIKACE AUTORA

1.

R. Fišer a I. Konopásek,

“Different modes of membrane permeabilization by two RTX toxins: HlyA from *Escherichia coli* and CyaA from *Bordetella pertussis*,”

***BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES*, vol. 1788, Červen 2009, s. 1249-1254.**

Elektronická verze publikace: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.019>

Celý text publikace v tištěné podobě práce: **Příloha č. 1**

IF₂₀₀₉=**3.998**, 2 citační ohlasy

Tato práce využívá jednoduchého modelového systému fosfolipidových váček – lipozómů – pro studium mechanismu, jakým CyaA a homologní toxin HlyA z bakterie *Escherichia coli* narušuje biologické membrány. Kromě naší studie se zatím nikdo nepokusil porovnat tyto dva RTX toxiny za identických experimentálních podmínek na jednom modelovém systému. Lipozómy, které jsme použili, byly naplněny fluorescenční sondou ANTS a jejím zhášecem DPX. Při narušování membrány lipozómů dochází k úniku sondy a/nebo zhášече, což se projevuje celkovým nárůstem intenzity fluorescence vzorku. V této studii jsme navíc využili takzvané zhášecí metody (Fluorescence reuquenching method), která umožní zjistit, která z látek ANTS/DPX prochází toxinovými kanály rychleji (Ladokhin et al. 1995). Vzhledem k tomu, že ANTS nese záporný náboj a DPX kladný, lze na výsledek pohlížet jako na iontovou selektivitu daného toxinového kanálu. Tato metoda určení iontové selektivity má však jednu zvláštní vlastnost; naměřená iontová selektivita odpovídá poměru reálných propustností pro oba ionty jen na značně velkých lipozomech. Je vcelku jednoduché si představit, že pro lipozóm rozměrů desítek nanometrů, který v sobě obsahuje řádově 10^3 molekul ANTS/DPX se při otevření membránového kanálu s propustností DPX:ANTS = 10:1 vyprázdní difúzí tak rychle, že uvnitř nezůstane ani ANTS ani DPX. Iontová selektivita tedy nebude měřitelná, jedná se o takzvaný únik stylem „vše-nebo-nic“. Proto jsme připravovali lipozómy různých definovaných velikostí. V případě CyaA jsme pozorovali vysokou iontovou selektivitu a pro HlyA selektivitu nízkou. Kromě zmiňovaných pokusů jsme ještě testovali mutantní formu CyaA, která má zaměněné záporně nabitě aminokyseliny v ústí predikovaného kanálu za zbytky s kladným nábojem.

Na této publikaci jsem se podílel nastudováním teorie zhášecí metody (Fluorescence reuquenching method), provedením veškerých pokusů, jejich vyhodnocením a přípravou rukopisu včetně obrazové dokumentace.

2.

M. Basler, O. Knapp, J. Mašín, R. Fišer, E. Maier, R. Benz, P. Šebo, a R. Osička,
“**Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of**
Bordetella adenylate cyclase toxin,”

***JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 282, Duben 2007, s. 12419-12429.**

Elektronická verze publikace: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M611226200>

Celý text publikace v tištěné podobě práce: **Příloha č. 2**

IF₂₀₀₇= **5.581**, 11 citačních ohlasů

Tato studie se zabývá transmembránovými segmenty CyaA, které jsou zodpovědné za tvorbu kanálu a za translokaci enzymatické AC domény. V celé sekvenci CyaA je predikováno celkem sedm transmembránových úseků (Osičková et al. 1999), z toho pět je v hydrofóbní oblasti a mohou se přímo účastnit tvorby kanálu. Elektrofyzilogická měření v této práci byla prováděna na planárních lipidových membránách (ze směsi sojových lipidů), do kterých byl zabudováván rekombinantní CyaA a jeho mutantní formy. Pokusy byly prováděny na Univerzitě ve Würzburgu, v laboratoři prof. Rolanda Benze.

Kanály, které oligomery CyaA v membránách tvoří jsou vysoce selektivní pro monovalentní kationty v porovnání s chloridovými anionty. Vnitřní průměr kanálu je překvapivě malý - do 0,8 nm, (viz výše) práce Ehrmann et al. (1991). Propustnost pro jednotlivé kationty je tedy závislá na jejich hydratačním obalu. Běžná vodivost jednotlivých kanálů je asi 40 pS v přítomnosti 1 M KCl, pH 7 (Benz, Maier, et al. 1994), měřené proudy jsou tedy asi 2 pA při 50 mV. Vodivost membrán v přítomnosti CyaA vykazuje strmou koncentrační závislost s Hillovým koeficientem okolo 3, s tím, že se očekává tvorba dočasných vodivých oligomerů toxinu, které jsou opět schopny disociace na neaktivní monomery. Doba otevření jednotlivých kanálů je v porovnání s jinými kanály tvořícími toxiny velmi malá, asi okolo 3 sekund. Dynamika tvorby oligomerních kanálů a jejich iontová selektivita se dají ovlivnit mutacemi v transmembránových segmentech CyaA, čímž se mimo jiné zabývá tato práce.

Při přípravě tohoto článku jsem prováděl veškeré pokusy na planárních lipidových membránách včetně jejich vyhodnocení. Z časových důvodů jsem však provedl charakterizaci jen šesti vybraných mutantních forem CyaA, ostatní toxiny byly charakterizovány jinými spoluautory. Jednalo se tedy o měření vodivosti jednotlivých kanálů CyaA, doby jejich otevření, iontové selektivity a celkové membránové aktivity. Podílel jsem se na přípravě části obrazové dokumentace.

3.

R. Fišer, J. Mašín, M. Basler, J. Krůšek, V. Špulaková, I. Konopásek, a P. Šebo,

“Third activity of Bordetella adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin - Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b⁺ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities,”

***JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 282, Únor 2007, s. 2808-2820.**

Elektronická verze publikace: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M609979200>

Celý text publikace v tištěné podobě práce: **Příloha č. 3**

IF₂₀₀₇= **5.581**, 13 citačních ohlasů

Tato práce se zabývá změnami v intracelulární koncentraci vápenatých iontů po interakci buněk makrofágů (linie J774A.1) s CyaA. Význam iontů Ca²⁺ pro buněčnou signalizaci je vysvětlen v úvodu dizertační práce. Z našich pozorování projevu „superhemolytických“ mutantních forem CyaA, které nevyvolávají zvýšený vstup vápenatých iontů do buněk, je zřejmé, že za tuto aktivitu nejsou zodpovědné kation-selektivní kanály tvořené samotným toxinem. Tyto „superhemolytické“ toxiny však prokazatelně tvoří zvýšené množství kanálů v umělých membránách (Osičková et al. 1999). Pokusili jsme se postupně blokovat vápníkové kanály lokalizované v plazmatické membráně či membráně endoplazmatického retikula a zjistili jsme, že patrně ve vstupu vápníku do buněk také nehrají výraznou roli. Nepodařilo se nám inhibovat vstup vápenatých iontů specifickými inhibitory buněčných kanálů exprimovaných na zkoumaných buňkách. I po vypuštění Ca²⁺ z ER pomocí thapsigarginu a narušení funkce mitochondrií působením FCCP stále dochází ke zvýšení [Ca²⁺]_i po účinku CyaA. Zvýšení [Ca²⁺]_i je tedy možné přičíst samotné molekule CyaA.

Z našich pokusů s mutantními toxiny neschopnými translokace AC domény je zřejmé, že na vstupu vápníku do buněk se podílí přímo molekula CyaA. Podle naší současné hypotézy se vstup vápníku odehrává současně s translokací adenylátcyklázové domény přes membránu.

V rámci této studie jsem s pomocí dalších kolegů vlastnoručně prováděl měření intracelulární koncentrace vápenatých iontů jak na fluorometru tak na mikroskopu. Podílel jsem se na návrhu pokusů, na přípravě obrazové dokumentace a původních verzích rukopisu.

4.

L. Bumba, J. Mašín, R. Fišer, a P. Šebo,

“Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Mobilizes Its beta(2) Integrin Receptor into Lipid Rafts to Accomplish Translocation across Target Cell Membrane in Two Steps,”

***PLOS PATHOGENS*, vol. 6, Květen 2010, e1000901**

Elektronická verze publikace: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000901>

Celý text publikace v tištěné podobě práce: **Příloha č. 4**

IF₂₀₀₉= **8.978**, 1 citační ohlas

V této studii bylo naším cílem zjistit, co se děje s molekulami CyaA vázanými na receptor CD11b/CD18 po toxinem indukovaném vstupu vápenatých iontů do cytoplazmy buněk. Uspořádání různých fosfolipidů a proteinů v plazmatické membráně buněk není náhodné, ale naopak se jednotlivé složky separují podle svých fyzikálních vlastností (Schafer et al. 2011). Mikrodomény obecně bohaté na satureované fosfolipidy, glykosfingolipidy, cholesterol a některé specifické proteinové receptory se nazývají lipidové rafty (Korade a Kenworthy 2008; Brdicka et al. 2000; Thomas et al. 2004). Tyto submikroskopické části membrány vykazují sníženou fluiditu, větší tloušťku membrány (Garcia-Saez et al. 2007) a při nízké teplotě jsou na rozdíl od okolní membrány odolné vůči neiontovým detergentům jako je Triton X-100 (Brown a London 2000; London a Brown 2000). Z tohoto důvodu jsou někdy nazývány také detergent rezistentní membrány (Detergent Resistant Membranes, DRM). Lipidové rafty jsou zodpovědné především za signalizaci a sestavování různých komplexů receptorových molekul. Jednou z mnoha molekul, které se v raftech mohou za určitých okolností nacházet, je i receptor pro CyaA, integrin CD11b/CD18 (Feuk-Lagerstedt et al. 2007). Přesunu těchto molekul do raftů napomáhají proteiny flotilin a caveolin (Allen et al. 2007). Některé typy endocytózy jsou zahajovány právě v lipidových raftech (Kirkham a Parton 2005).

V naší studii jsme ukázali, že CyaA se váže na komplex CD11b/CD18 mimo lipidové rafty a že zde indukuje vstup vápenatých iontů do cytoplazmy. Zvýšená hladina $[Ca^{2+}]_i$ vyvolává aktivaci proteázy kalpainu, která svou aktivitou štěpí protein talin spojující CD11b s buněčným aktinovým cytoskeletem. Konečným důsledkem je přesun CyaA+CD11b/CD18 do membránových raftů, kde je patrně dokončena translokace celé AC domény a případně následuje její odštěpení do cytozolu. Na této publikaci jsem se podílel měřením intracelulární koncentrace vápenatých iontů v buňkách J774A.1 a U937 na fluorometru.

5.

R. Fišer, J. Mašín, L. Bumba, E. Pospíšilová, C. Fayolle, M. Basler, L. Sadílková, J.

Kamanová, J. Černý, I. Konopásek, R. Osička, C. Leclerc, a P. Šebo,

“Calcium influx and relocation into lipid rafts rescue *Bordetella* hemolysin from macropinocytic uptake and enable it to permeabilize phagocyte membrane,”

***PLOS PATHOGENS*, 2011. V recenzním řízení**

Celý text publikace v tištěné podobě práce: **Příloha č. 5**

Buňky napadené adenylátcyklázovým toxinem se snaží účinkům toxinu bránit a to například jeho proteolytickou degradací (Bumba et al. 2010). To však často vede k odštěpení již translokované AC domény do cytozolu, kde je enzym stále funkční a může nadále narušovat buněčnou signalizaci. Jinou možností je pro buňku odklizení CyaA z membrány pomocí endocytózy. Endocytóza je obecně proces, kterým buňky pohlcují molekuly z okolního prostředí po navázání na buněčnou membránu. Tímto způsobem jsou pohlcovány především velké molekuly proteinů nebo polysacharidů, které nemohou přecházet přes buněčnou membránu difúzí. Endocytóza u savčích buněk může probíhat několikerým způsobem. Může být zprostředkována váčky obalenými buď clathrinem (Aridor a Traub 2002) nebo caveolinem (Le a Nabi 2003), případně probíhá pomocí neobalených váček (Kirkham a Parton 2005). Další rozdělení endocytózy lze provést podle velikosti pohlcovaných částic; pinocytóza je spojována s váčky menšími než asi 200 nm (všechny dříve uvedené možnosti), zatímco fagocytózou může buňka pohlcovat např. celé bakteriální buňky. Po oddělení endocytického váčku od plazmatické membrány buňky dochází ke třídění endocytovaných molekul v raných endozómech. Některé molekuly jsou okamžitě dopravovány na zpět na povrch buňky k opakovanému použití (nejčastěji buněčné recyklující receptory, transferrin). Ostatní molekuly jsou transportovány do pozdních endozómů a lysozómů k degradaci. O tom, zda dojde k recyklaci časného endozómu, nebo jeho přeměně na pozdní endozóm rozhodují například Rab proteiny (Daro et al. 1996; Miaczynska a Zerial 2002; Murray et al. 2002), případně ubiquitinace přenášených molekul (Bache et al. 2003). Kromě molekuly, která je endocytována a jejího receptoru na mebráně se v endozómech nalézají různé jiné molekuly, které dávají danému endozómu charakteristické vlastnosti. Pomocí těchto molekul je například regulováno endozomální pH (které má vliv na degradaci endozomálního obsahu), tvar endozómů, jejich aktivní transport a fúze s dalšími organelami (Mellman 1996; Duclos et al. 2000). V rámci této studie jsem vlastnoručně prováděl většinu mikroskopických pozorování včetně vyhodnocení, přípravy obrazové dokumentace a videí.

DISKUZE

Sjednocujícím tématem této dizertační práce je adenylátcyklázový toxin, produkováný patogenní bakterií *Bordetella pertussis*. Pro všechny příložené publikace je společné studium interakce tohoto toxinu s fosfolipidovou dvojvrstvou biologické membrány, ať už in vitro – práce Fišer a Konopásek (2009), Basler et al. (2007) nebo na živých buňkách nesoucích specifický receptor a schopných aktivní obrany proti CyaA – práce Fišer et al. (2007), Bumba et al. (2010) a Fišer et al. (2011).

V případě studia CyaA na umělých systémech je třeba uvažovat o aktivitě toxinu s ohledem na membránový potenciál, který je nezbytný pro zcela definovanou a orientovanou inzerci CyaA do fosfolipidové dvojvrstvy (Knapp et al. 2008) a následně pro případnou translokaci AC domény přes tuto membránu. Studium CyaA a jiných RTX toxinů na lipozómech, tedy nejjednodušším modelovém systému, kde však není membránový potenciál, bylo v minulosti prováděno již několikrát. Při těchto pokusech se sleduje únik fluorescenčních sond z lipozómů (Mašín et al. 2004; Martin et al. 2004). V těchto studiích je nutné počítat s tím, že velká část molekul CyaA, které jsou k membránám přidávány v denaturované formě (ze zásobního roztoku 8M močoviny), nezaujme v membráně správnou konformaci. Takovéto molekuly mohou být buď úplně inaktivní, nebo způsobovat nespecifické narušování membrány. Vzhledem k tomu, jak malé jsou kanály CyaA pozorované na jiných systémech (Ehrmann et al. 1991; Benz, Maier, et al. 1994), je jasné, že úniku fluorescenčních sond z lipozómů může v první řadě bránit vnitřní průřez kanálů CyaA. Fluorescenční sondy běžně používané pro studium narušování membrány (karboxy-fluorescein, calcein) nesou záporný náboj a dá se tedy očekávat, že nebudou kationt-selektivním kanálem vůbec prostupovat. V závěrech se uvádí, že CyaA na lipozómech tvoří rozsáhlejší agregáty umožňující například i průnik fluorescenčně značených dextranů (Mašín et al. 2004). V práci Fišer et al. (2009) jsme pro analýzu narušování membrány lipozómů používali dvojici molekul; záporně nabitou sondu ANTS a kladně nabitý zhášec DPX (Ladokhin et al. 1995). Metoda umožňuje zjistit množství každé z látek uvnitř a venku lipozómů a tedy vypočítat podíl propustností pro tyto dvě látky. Naše výsledky ukazují, že přednostně prochází kanály CyaA zhášec DPX i při poměrně malých koncentracích toxinu (řádově nmol/l). Podle našich výsledků tedy CyaA netvoří rozsáhlejší poškození membrány lipozómů, ale spíše definované dočasné kanály (v tomto případě i na membránách bez elektrického potenciálu). Naměřená kationtová selektivita je navíc závislá na bodových mutacích CyaA v předpokládaném ústí kanálu (mutace

E509K+E516K), což naznačuje podobné vlastnosti póru jako při měření na planárních lipidových membránách. Tyto výsledky nemusí být v rozporu s pozorováním, že pro únik záporně nabitých molekul sondy je potřeba vyšších koncentrací CyaA. V naší publikaci byl rovněž charakterizován mechanismus úniku ANTS/DPX účinkem HlyA, tedy příbuzného RTX toxinu produkovaného *E. coli*. V tomto případě jsme pozorovali neselektivní únik odpovídající patrně výrazně většímu rozměru kanálů HlyA (Ostolaza et al. 1993; Benz, Hardie, et al. 1994). Po vydání publikace Fišer et al. (2009) byly vydány další inspirativní práce popisující možnosti měření mechanismu úniku obsahu lipozómů pomocí časově rozlišené fluorescence (Patel et al. 2009; Apellaniz et al. 2010). Tento přístup v budoucnu umožní jednoduché sledování tohoto procesu bez pracných titrací zhášečem prováděných při klasické fluorescenční zhášečí metodě (Ladokhin et al. 1995). Pro naše účely by navíc bylo výhodné používat dvojici sonda/zhášeč, kde zhášečem by byl monovalentní kationt. Naše předběžné pokusy se zhášením ANTS pomocí iontů Cs⁺ však zatím nebyly úspěšné (Fišer, nepublikované výsledky).

Další práce se zabývá významem jednotlivých predikovaných transmembránových helixů v hydrofóbní doméně CyaA a to jak pro tvorbu kanálu, tak pro unikátní proces translokace AC domény (Basler et al. 2007). Pro tyto účely byla sestavena řada mutantních rekombinantních proteinů, které byly exprimovány v *E. coli* a jejichž vlastnosti byly testovány na erythrocytech a planárních lipidových membránách. Jednotlivé zkoumané úseky CyaA jsou popsány ve zmíněné publikaci. Podařilo se nám identifikovat aminokyselinové zbytky, které tvoří záporně nabitě povrchy v ústí kanálu CyaA. První pokusy tohoto typu vedly k nálezům dvou glutamátů v pozicích E509 a E516, které zodpovídají za iontovou selektivitu kanálu (Osičková et al. 1999). Ve své práci jsme objevili aminokyselinový zbytek E570, který tvoří podobný iontový filtr na dalším transmembránovém helixu (Tab. 1, Obr. 5). Kromě toho byl objeven aminokyselinový zbytek E581, který se patrně přímo účastní translokace AC domény, neboť po jeho mutagenezi na lyzin byla translokace inhibována. Tyto nálezy jsou zajímavé hlavně proto, že ostatní nalézané mutace zastavující translokaci AC domény bývají přímo v této doméně a většinou mění její kladný celkový náboj (Karimova, Fayolle, et al. 1998), který je pro translokaci (pravděpodobně poháněnou membránovým potenciálem) nezbytný. Aspartáty v pozicích 557 a 558 na smyčce pravděpodobně spojující dva výše zmiňované helixy a rovněž se tvorby iontového filtru částečně účastní. Pro objasnění způsobu translokace AC domény může být zajímavá například mutace E509P, kde prolin vložený doprostřed α -helixu zamezí úplné translokaci. AC doména je pak uvězněna v podobě

translokačního intermediátu, kdy je dostupná proteolytickému štěpení zvenku a zároveň může v jisté míře zasahovat do cytozolu.

Další práce vycházely ze základního pozorování, kdy přídavek CyaA k buňkám nesoucím receptor CD11b/CD18 vyvolává vzestup intracelulární koncentrace iontů Ca^{2+} (Fišer et al. 2007). Snaha pozměňovat hladinu $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a tím manipulovat s hostitelskou buňkou, je společná pro různé toxiny produkované živočišnými patogeny (Nhieu et al. 2004). Nejzajímavější na aktivitě CyaA je skutečnost, že Ca^{2+} neproudí do buňky hemolytickým kanálem, nýbrž tranzientním pórem, který se vytváří při translokaci AC domény přes cytoplazmatickou membránu. Při pokusech na planárních lipidových membránách se zatím nepodařilo tento jev zachytit, nejspíš kvůli absenci cholesterolu, případně receptoru CD11b. Uvažovali jsme o možnosti, že by ionty Ca^{2+} nově přicházející do buňky mohly vyvolat aktivaci kalmodulinu, který je nezbytný pro stimulaci adenylátcyklázové aktivity CyaA, podobně jako u edema toxinu bakterie *Bacillus anthracis* (Kumar et al. 2002). Tuto hypotézu se však nepodařilo prokázat, protože zablokování vstupu Ca^{2+} nespecifickým inhibitorem různých vápníkových kanálů, včetně CyaA (inhibice lanthanitým iontem La^{3+}), nezabránilo AC aktivitě uvnitř makrofágů. Možné vysvětlení je i takové, že vlivem La^{3+} nedochází ke kompletní blokaci vstupu Ca^{2+} do buněk, a že pro aktivaci kalmodulinu v bezprostřední blízkosti plazmatické membrány stačí i slabé a lokální zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dokonce se zdá, že tato předpokládaná lokálně zvýšená hladina $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stačí pro aktivaci proteázy kalpainu, který štěpí protein talin, kotvící receptor CD11b k aktinovému cytoskeletu (Bumba et al. 2010). Aktivace kalpainu je přitom potřebná právě v blízkosti plazmatické membrány a dá se částečně indukovat ionomycinem (na rozdíl od thapsigarginu, který zvyšuje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ v celé cytoplazmě). Podle naší představy vede uvolnění CD11b z cytoskeletu k přesunu komplexu receptor-toxin do lipidových raftů, kde je translokace AC domény dokončena. Zatím není zřejmé, jestli je přesun do raftů aktivní, či spíše pasivní proces. Je však možné, že by určitou roli v segregaci komplexu CyaA+CD11b/CD18 uvolněného z cytoskeletu mohla hrát i kyselina palmitová vázaná na CyaA (Levental et al. 2010). K úplné translokaci AC domény je tedy zřejmě vyžadována přítomnost cholesterolu obsaženého v raftech. Zdá se, že cholesterol hraje v aktivitě CyaA zásadní roli, ačkoliv zde nejde o složku membrány nutnou pro endocytózu CyaA jako u jiných bakteriálních toxinů (Sandvig a van Deurs 2002). Deplece cholesterolu pomocí methyl- β -cyclodextrinu vede k neschopnosti CyaA AC doménu translokovat. Ionty Ca^{2+} vpouštěné adenylátcyklázovým toxinem do buněk sehrávají ještě jednu důležitou úlohu. Jsou schopny opozdit „uklizení“ CyaA z povrchu buněk (Fišer et al. 2011). Toxin CyaA-

E570K+E581P zbavený schopnosti zvyšovat $[Ca^{2+}]_i$ je z membrány odstraňován makropinocytózou, což platí i o detoxifikované mutované variantě (tedy toxoidu CyaA-E570K+E581P-AC⁻) neschopné syntézy cAMP. Toxoid CyaA-AC⁻ se zachovanou aktivitou vstupu Ca^{2+} do buněk (bez schopnosti syntézy cAMP) se na plazmatické membráně udržuje asi o 10-15 minut delší dobu a může se tak déle projevovat například jeho schopnost vypouštět ionty K^+ z cytoplazmy (Fišer et al. 2011; Dunne et al. 2010), a tím déle narušovat iontovou rovnováhu buňky. Toxoid CyaA-AC⁻ je později endocytován pomocí clathrinových váčků a degradován v buněčných lysozómech, jak již bylo pozorováno dříve (Schlecht et al. 2004).

REFERENCE

- Alford, A., Yellowley, C., Jacobs, C., a Donahue, H. 2003. Increases in cytosolic calcium, but not fluid flow, affect aggrecan mRNA levels in articular chondrocytes. *JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY* **90**: 938-944.
- Allen, J., Halverson-Tamboli, R., a Rasenick, M. 2007. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE* **8**: 128-140.
- Apellaniz, B., Nieva, J., Schwille, P., a Saez, A. 2010. All-or-None versus Graded Single-Vesicle Analysis Reveals Lipid Composition Effects on Membrane Permeabilization. *BIOPHYSICAL JOURNAL* **99**: 3619-3628.
- Aridor, M., a Traub, L. 2002. Cargo selection in vesicular transport: The making and breaking of a coat. *TRAFFIC* **3**: 537-546.
- Bache, K., Raiborg, C., Mehlum, A., a Stenmark, H. 2003. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **278**: 12513-12521.
- Barski, J., Hartmann, J., Rose, C., Hoebeek, F., Morl, K., Noll-Hussong, M., De Zeeuw, C., Konnerth, A., a Meyer, M. 2003. Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE* **23**: 3469-3477.
- Basar, T., Havlicek, V., Bezouskova, S., Hackett, M., a Šebo, P. 2001. Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of Bordetella pertussis adenylate cyclase - Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **276**: 348-354.
- Basar, T., Havlicek, V., Bezouskova, S., Halada, P., Hackett, M., a Šebo, P. 1999. The conserved lysine 860 in the additional fatty-acylation site of Bordetella pertussis adenylate cyclase is crucial for toxin function independently of its acylation status. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **274**: 10777-10783.
- Basler, M., Knapp, O., Mašín, J., Fišer, R., Maier, E., Benz, R., Šebo, P., a Osička, R. 2007. Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of Bordetella adenylate cyclase toxin. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **282**: 12419-12429.
- Basler, M., Masin, H., Osicka, R., a Šebo, P. 2006. Pore-forming and enzymatic activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *INFECTIO AND IMMUNITY* **74**: 2207-2214.
- Bassinat, L., Gueirard, P., Maitre, B., Housset, B., Gounon, P., a Guiso, N. 2000. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by Bordetella pertussis. *INFECTIO AND IMMUNITY* **68**: 1934-1941.
- Baugh, V., a McCarthy, N. 2010. Outbreak of Bordetella pertussis among oncology nurse specialists. *OCCUPATIONAL MEDICINE-OXFORD* **60**: 401-405.

- Benz, R., Hardie, K., A Hughes, C. 1994. Pore Formation In Artificial Membranes By The Secreted Hemolysins Of *Proteus-Vulgaris* And *Morganella-Morganii* *EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY* **220**: 339-347.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A., A Šebo, P. 1994. Adenylate-Cyclase Toxin (CyaA) Of *Bordetella-Pertussis* - Evidence For The Formation Of Small Ion-Permeable Channels And Comparison With HlyA Of *Escherichia-coli*. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **269**: 27231-27239.
- van den Berg, B., Beekhuizen, H., Willems, R., Mooi, F., a van Furth, R. 1999. Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *INFECTIO AND IMMUNITY* **67**: 1056-1062.
- Berridge, M., Bootman, M., a Lipp, P. 1998. Calcium - a life and death signal. *NATURE* **395**: 645-648.
- Betsou, F., Šebo, P., A Guiso, N. 1993. CyaC-Mediated Activation Is Important Not Only For Toxic But Also For Protective Activities Of *Bordetella-Pertussis* Adenylate Cyclase-Hemolysin. *INFECTIO AND IMMUNITY* **61**: 3583-3589.
- Brdicka, T. et al. 2000. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase Csk and is involved in regulation of T cell activation. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **191**: 1591-1604.
- Brown, D., a London, E. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **275**: 17221-17224.
- Bumba, L., Mašín, J., Fišer, R., a Šebo, P. 2010. *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Mobilizes Its beta(2) Integrin Receptor into Lipid Rafts to Accomplish Translocation across Target Cell Membrane in Two Steps. *PLOS PATHOGENS* **6**(5): e1000901 http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=30&SID=V2C4mIh@ABkiI4pof9i&page=1&doc=1 (Přistoupeno Listopad 18, 2010).
- Clapham, D. 1995. CALCIUM SIGNALING. *CELL* **80**: 259-268.
- Cockeran, R., Theron, A., Steel, H., Matlola, N., Mitchell, T., Feldman, C., a Anderson, R. 2001. Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* **183**: 604-611.
- Confer, D., a Eaton, J. 1982. Phagocyte Impotence Caused By An Invasive Bacterial Adenylate-Cyclase . *SCIENCE* **217**: 948-950.
- Cudd, L., Clarke, C., a Clinkenbeard, K. 2003. Contribution of intracellular calcium stores to an increase in cytosolic calcium concentration induced by *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS* **225**: 23-27.
- Daro, E., vanderSluijs, P., Galli, T., a Mellman, I. 1996. Rab4 and cellubrevin define different

- early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF* **93**: 9559-9564.
- Dautin, N., Karimova, G., a Ladant, D. 2002. Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin: a versatile screening tool. *TOXICON* **40**: 1383-1387.
- DeMali, K., Whiteford, C., Ulug, E., a Kazlauskas, A. 1997. Platelet-derived growth factor-dependent cellular transformation requires either phospholipase C gamma or phosphatidylinositol 3 kinase. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **272**: 9011-9018.
- Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H., a Desjardins, M. 2000. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *JOURNAL OF CELL SCIENCE* **113**: 3531-3541.
- Dunne, A. et al. 2010. Inflammasome Activation by Adenylate Cyclase Toxin Directs Th17 Responses and Protection against Bordetella pertussis. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **185**: 1711-1719.
- Ehrmann, I., Gray, M., Gordon, V., Gray, L., A Hewlett, E. 1991. Hemolytic-Activity Of Adenylate-Cyclase Toxin From Bordetella-Pertussis. *FEBS LETTERS* **278**: 79-83.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., A Wall, R. 1984. Analysis Of Membrane And Surface Protein Sequences With The Hydrophobic Moment Plot. *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY* **179**: 125-142.
- Eisenberg, D., Weiss, R., A Terwilliger, T. 1984. The Hydrophobic Moment Detects Periodicity In Protein Hydrophobicity. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF* **81**: 140-144.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Šebo, P., Ladant, D., a Leclerc, C. 2003. Interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase with CD11b/CD18 - Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **278**: 38514-38521.
- Feuk-Lagerstedt, E., Movitz, C., Pellme, S., Dahlgren, C., a Karlsson, A. 2007. Lipid raft proteome of the human neutrophil azurophil granule. *PROTEOMICS* **7**: 194-205.
- Fišer, R., a Konopásek, I. 2009. Different modes of membrane permeabilization by two RTX toxins: HlyA from Escherichia coli and CyaA from Bordetella pertussis. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES* **1788**: 1249-1254.
- Fišer, R., Mašín, J., Basler, M., Krůšek, J., Špuláková, V., Konopásek, I., a Šebo, P. 2007. Third activity of Bordetella adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin - Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b(+) monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **282**: 2808-2820.

- Fišer, R. et al. 2011. Calcium influx and relocation into lipid rafts rescue Bordetella hemolysin from macropinocytic uptake and enable it to permeabilize phagocyte membrane. *PLOS PATHOGENS*. Submitted
- Garcia-Saez, A., Chiantia, S., a Schwille, P. 2007. Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **282**. http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=62&SID=N2mPljni2@jmm4Bihpn&page=1&doc=1 (Přistoupeno Únor 2, 2011).
- Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A., A Danchin, A. 1988. The Calmodulin-Sensitive Adenylate-Cyclase Of Bordetella-Pertussis - Cloning And Expression In Escherichia-Coli. *MOLECULAR MICROBIOLOGY* **2**: 19-30.
- Goll, D., Thompson, V., Li, H., Wei, W., a Cong, J. 2003. The calpain system. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* **83**: 731-801.
- Gray, M., Szabo, G., Otero, A., Gray, L., a Hewlett, E. 1998. Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by Bordetella pertussis AC toxin. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **273**: 18260-18267.
- de Greeff, S., de Melker, H., van Gageldonk, P., Schellekens, J., van der Klis, F., Mollema, L., Mooi, F., a Berbers, G. 2010. Seroprevalence of Pertussis in the Netherlands: Evidence for Increased Circulation of Bordetella pertussis. *PLOS ONE* **5**. http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=16&SID=Q15DMgkmEf7gf7F1D7I&page=1&doc=1 (Přistoupeno Únor 9, 2011).
- Guermontprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., a Leclerc, C. 2001. The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* **193**: 1035-1044.
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y., Gibbs, C., Mrksich, M., a Tang, W. 2005. Structural basis for the interaction of Bordetella pertussis adenylyl cyclase toxin with calmodulin. *EMBO JOURNAL* **24**: 3190-3201.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D., A Hewlett, E. 1994. Internal Lysine Palmitoylation In Adenylate-Cyclase Toxin From Bordetella-Pertussis. *SCIENCE* **266**: 433-435.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., a Hewlett, E.L. 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis. *Science* **266**: 433-435.
- Hackett, M. Et Al. 1995. Hemolytic, But Not Cell-Invasive Activity, Of Adenylate-Cyclase Toxin Is Selectively Affected By Differential Fatty-Acylation In Escherichia-Coli. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **270**: 20250-20253.
- Hanski, E. 1989. Invasive Adenylate-Cyclase Toxin Of Bordetella-Pertussis. *TRENDS IN*

- Hochwald, O., Bamberger, E., Rubin, L., Gershtein, R., a Srugo, I. 2010. A Pertussis Outbreak among Daycare Children in Northern Israel: Who Gets Sick? *ISRAEL MEDICAL ASSOCIATION JOURNAL* **12**: 283-286.
- Karimova, G., Fayolle, C., Gmira, S., Ullmann, A., Leclerc, C., a Ladant, D. 1998. Charge-dependent translocation of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: Implication for the in vivo delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF* **95**: 12532-12537.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., a Ladant, D. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF* **95**: 5752-5756.
- Kirkham, M., a Parton, R. 2005. Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR CELL RESEARCH* **1745**: 273-286.
- Kmetzsch, L. et al. 2010. The Vacuolar Ca²⁺ Exchanger Vcx1 Is Involved in Calcineurin-Dependent Ca²⁺ Tolerance and Virulence in Cryptococcus neoformans. *EUKARYOTIC CELL* **9**: 1798-1805.
- Knapp, O., Maier, E., Masin, J., Šebo, P., a Benz, R. 2008. Pore formation by the Bordetella adenylate cyclase toxin in lipid bilayer membranes: Role of voltage and pH. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES* **1778**: 260-269.
- Korade, Z., a Kenworthy, A. 2008. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *NEUROPHARMACOLOGY* **55**: 1265-1273.
- Koschinski, A., Repp, H., Unver, B., Dreyer, F., Brockmeier, D., Valeva, A., Bhakdi, S., a Walev, I. 2006. Why Escherichia coli alpha-hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells - the pore is on its own. *FASEB JOURNAL* **20**: 973-+.
- Krause, K., Fivaz, M., Monod, A., a van der Goot, F. 1998. Aerolysin induces G-protein activation and Ca²⁺ release from intracellular stores in human granulocytes. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **273**: 18122-18129.
- Kretzschmar, M., Teunis, P., a Pebody, R. 2010. Incidence and Reproduction Numbers of Pertussis: Estimates from Serological and Social Contact Data in Five European Countries. *PLOS MEDICINE* **7**. http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=22&SID=Q15DMgkmEf7gf7F1D7I&page=1&doc=1 (Přistoupeno Únor 9, 2011).
- Kumar, P., Ahuja, N., a Bhatnagar, R. 2002. Anthrax edema toxin requires influx of calcium for inducing cyclic AMP toxicity in target cells. *INFECTION AND IMMUNITY* **70**: 4997-5007.

- Kyte, J., a Doolittle, R. 1982. A Simple Method For Displaying The Hydrophobic Character Of A Protein. *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY* **157**: 105-132.
- Ladant, D., a Ullmann, A. 1999. Bordetella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *TRENDS IN MICROBIOLOGY* **7**: 172-176.
- Ladokhin, A., Wimley, W., a White, S. 1995. Leakage of membrane vesicle contents: Determination of mechanism using fluorescence reuquenching. *BIOPHYSICAL JOURNAL* **69**: 1964-1971.
- LaFerla, F. 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE* **3**: 862-872.
- Lamberti, Y., Hayes, J., Vidakovics, M., a Rodriguez, M. 2009. Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by Bordetella pertussis. *FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY* **56**: 143-150.
- Le, P., a Nabi, I. 2003. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *JOURNAL OF CELL SCIENCE* **116**: 1059-1071.
- Levental, I., Grzybek, M., a Simons, K. 2010. Greasing Their Way: Lipid Modifications Determine Protein Association with Membrane Rafts. *BIOCHEMISTRY* **49**: 6305-6316.
- Linhartova, I. et al. 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS* **34**: 1076-1112.
- Locht, C., Antoine, R., a Jacob-Dubuisson, F. 2001. Bordetella pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects. *CURRENT OPINION IN MICROBIOLOGY* **4**: 82-89.
- London, E., a Brown, D. 2000. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES* **1508**: 182-195.
- Mackova, J., Stasikova, J., Kutinova, L., Masin, J., Hainz, P., Simsova, M., Gabriel, P., Šebo, P., a Nemeckova, S. 2006. Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY* **55**: 39-46.
- Mackrill, J., Challiss, R., OConnell, D., Lai, F., a Nahorski, S. 1997. Differential expression and regulation of ryanodine receptor and myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels in mammalian tissues and cell lines. *BIOCHEMICAL JOURNAL* **327**: 251-258.
- Martin, C., Requero, M., Masin, J., Konopasek, I., Goni, F., Šebo, P., a Ostolaza, H. 2004. Membrane restructuring by Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* **186**: 3760-3765.

- Mašín, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopasek, I., Benz, R., Leclerc, C., a Šebo, P. 2005. Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of Bordetella adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *BIOCHEMISTRY* **44**: 12759-12766.
- Mašín, J., Konopasek, I., Svobodova, J., a Šebo, P. 2004. Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES* **1660**: 144-154.
- Mattoo, S., Foreman-Wykert, A., Cotter, P., a Miller, J. 2001. Mechanisms of Bordetella pathogenesis. *FRONTIERS IN BIOSCIENCE* **6**: E168-E186.
- Mattoo, S., a Cherry, J. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to Bordetella pertussis and other Bordetella subspecies. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* **18**: 326-+.
- Mellman, I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *ANNUAL REVIEW OF CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY* **12**: 575-625.
- Miaczynska, M., a Zerial, M. 2002. Mosaic organization of the endocytic pathway. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* **272**: 8-14.
- Mock, M., a Ullmann, A. 1993. Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors. *Trends Microbiol* **1**: 187-192.
- Morova, J., Osicka, R., Masin, J., a Šebo, P. 2008. RTX cytotoxins recognize beta(2) integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF* **105**: 5355-5360.
- MuniEr, H., Gilles, A., Glaser, P., Krin, E., Danchin, A., Sarfati, R., A Barzu, O. 1991. Isolation And Characterization Of Catalytic And Calmodulin-Binding Domains Of Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase. *EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY* **196**: 469-474.
- Murray, J., Panaretou, C., Stenmark, H., Miaczynska, M., a Backer, J. 2002. Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *TRAFFIC* **3**: 416-427.
- Nhieu, G., Clair, C., Grompone, G., a Sansonetti, P. 2004. Calcium signalling during cell interactions with bacterial pathogens. *BIOLOGY OF THE CELL* **96**: 93-101.
- Nicchitta, C., a Williamson, J. 1984. Spermine - A Regulator Of Mitochondrial Calcium Cycling. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **259**: 2978-2983.
- Osičková, A., Masin, J., Fayolle, C., Krusek, J., Basler, M., Pospisilova, E., Leclerc, C., Osicka, R., a Šebo, P. 2010. Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *MOLECULAR MICROBIOLOGY* **75**: 1550-1562.
- Osičková, A., Osička, R., Maier, E., Benz, R., a Šebo, P. 1999. An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane

- channels. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **274**: 37644-37650.
- Ostolaz A, H., Bartolome, B., Dezarate, I., Delacruz, F., A Goni, F. 1993. Release Of Lipid Vesicle Contents By The Bacterial Protein Toxin Alpha-Hemolysin. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA* **1147**: 81-88.
- Otero, A., Yi, X., Gray, M., Szabo, G., A Hewlett, E. 1995. Membrane Depolarization Prevents Cell Invasion By Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase Toxin. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **270**: 9695-9697.
- Patel, H., Tscheka, C., a Heerklotz, H. 2009. Characterizing vesicle leakage by fluorescence lifetime measurements. *SOFT MATTER* **5**: 2849-2851.
- Relman N, D., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R., A Falkow, S. 1989. Filamentous Hemagglutinin Of Bordetella-Pertussis - Nucleotide Sequence And Crucial Role In Adherence. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF* **86**: 2637-2641.
- Repp, H., Pamukci, Z., Koschinski, A., Domann, E., Darji, A., Birringer, J., Brockmeier, D., Chakraborty, T., a Dreyer, F. 2002. Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations. *CELLULAR MICROBIOLOGY* **4**: 483-491.
- Rhodes, C., Gray, M., Watson, J., Muratore, T., Kim, S., Hewlett, E., a Grisham, C. 2001. Structural consequences of divalent metal binding by the adenyl cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* **395**: 169-176.
- Rogel, A., A Hanski, E. 1992. Distinct Steps In The Penetration Of Adenylate-Cyclase Toxin Of *Bordetella-Pertussis* Into Sheep Erythrocytes - Translocation Of The Toxin Across The Membran. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **267**: 22599-22605.
- Rogel, A., Meller, R., A Hanski, E. 1991. Adenylate-Cyclase Toxin From *Bordetella-Pertussis* - The Relationship Between Induction Of Camp And Hemolysis. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **266**: 3154-3161.
- RosE, T., Šebo, P., Bellalou, J., A Ladant, D. 1995. Interaction Of Calcium With *Bordetella-Pertussis* Adenylate-Cyclase Toxin. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **270**: 26370-26376.
- RowliNg, P., Mclaughlin, S., Pollock, G., A Freedman, R. 1994. A Single Purification Procedure For The Major Resident Proteins Of The Er Lumen - Endoplasmin, Bip, Calreticulin And Protein Disulfide-Isomerase *PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION* **5**: 331-336.
- Sakamoto, H., Bellalou, J., Šebo, P., A Ladant, D. 1992. *Bordetella-Pertussis* Adenylate-Cyclase Toxin - Structural And Functional Independence Of The Catalytic And Hemolytic Activitie. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **267**: 13598-13602.
- Sandvig, K., a van Deurs, B. 2002. Transport of protein toxins into cells: pathways used by

- ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS LETTERS* **529**: 49-53.
- Šebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H., A Ullmann, A. 1991. High-Level Synthesis Of Active Adenylate-Cyclase Toxin Of Bordetella-Pertussis In A Reconstructed Escherichia-Coli System. *GENE* **104**: 19-24.
- Sergeant, G., Bradley, E., Thornbury, K., McHale, N., a Hollywood, M. 2008. Role of mitochondria in modulation of spontaneous Ca²⁺ waves in freshly dispersed interstitial cells of Cajal from the rabbit urethra. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON* **586**: 4631-4642.
- Shevchuk, A., Gorelik, J., Harding, S., Lab, M., Klenerman, D., a Korchev, Y. 2001. Simultaneous measurement of Ca²⁺ and cellular dynamics: Combined scanning ion conductance and optical microscopy to study contracting cardiac myocytes. *BIOPHYSICAL JOURNAL* **81**: 1759-1764.
- Short, S., Boyer, J., a Juliano, R. 2000. Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in G protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **275**: 12970-12977.
- Schafer, L., de Jong, D., Holt, A., Rzepiela, A., de Vries, A., Poolman, B., Killian, J., a Marrink, S. 2011. Lipid packing drives the segregation of transmembrane helices into disordered lipid domains in model membranes. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF* **108**: 1343-1348.
- Schlecht, G., Loucka, J., Najar, H., Šebo, P., a Leclerc, C. 2004. Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4(+) and CD8(+) T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY* **173**: 6089-6097.
- Taylor, J., Zeng, X., Pottle, J., Lee, K., Wang, A., Yi, S., Scruggs, J., Sikka, S., a Li, M. 2008. Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY* **14**: 4984-4991.
- Thomas, S., Preda-Pais, A., Casares, S., a Brumeanu, T. 2004. Analysis of lipid rafts in T cells. *MOLECULAR IMMUNOLOGY* **41**: 399-409.
- Timmins, J. et al. 2009. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* **119**: 2925-2941.
- To, M., Aromataris, E., Castro, J., Roberts, M., Barritt, G., a Rychkov, G. 2010. Mitochondrial uncoupler FCCP activates proton conductance but does not block store-operated Ca²⁺ current in liver cells. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* **495**: 152-158.
- Uhlen, P. et al. 2000. alpha-Haemolysin of uropathogenic E-coli induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells. *NATURE* **405**: 694-697.
- Urisu, A., Cowell, J., A Manclark, C. 1986. Filamentous Hemagglutinin Has A Major Role In

- Mediating Adherence Of Bordetella-Pertussis To Human Widr Cells. *INFECTION AND IMMUNITY* **52**: 695-701.
- Viklund, H., a Elofsson, A. 2008. OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar. *BIOINFORMATICS* **24**: 1662-1668.
- Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., Benada, O., Benz, R., a Šebo, P. 2009. Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin. *FASEB JOURNAL* **23**: 2831-2843.
- Walter, L., a Hajnoczky, G. 2005. Mitochondria and endoplasmic reticulum: The lethal interorganelle cross-talk. *JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES* **37**: 191-206.
- Wolff, J., Cook, G., Goldhammer, A., A Berkowitz, S. 1980. Calmodulin Activates Prokaryotic Adenylate-Cyclase. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF* **77**: 3841-3844.
- Wulf-JohanssOn, H., Amrutkar, D., Hay-Schmidt, A., Poulsen, A., Klaerke, D., Olesen, J., A Jansen-Olesen, I. 2010. Localization Of Large Conductance Calcium-Activated Potassium Channels And Their Effect On Calcitonin Gene-Related Peptide Release In The Rat Trigemino-Neuronal Pathway. *NEUROSCIENCE* **167**: 1091-1102.
- Yarov-Yarovoy, V., Schonbrun, J., a Baker, D. 2006. Multipass membrane protein structure prediction using Rosetta. *PROTEINS-STRUCTURE FUNCTION AND BIOINFORMATICS* **62**: 1010-1025.
- Zouari, A. et al. 2011. The re-emergence of pertussis in Tunisia. *Med Mal Infect.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215539> (Přistoupeno Únor 9, 2011).